

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003130

International filing date: 25 February 2005 (25.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-054554  
Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/JP2005/003130

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

03.03.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2004年 2月27日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2004-054554

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

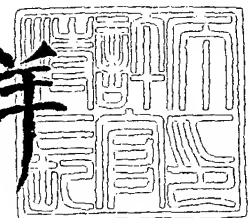
J P 2004-054554

出 願 人  
Applicant(s): 不二製油株式会社  
小林 浩

2005年 4月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号 出証特2005-303077'

【書類名】 特許願  
【整理番号】 PR14300S  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61P 35/04  
A61K 38/56 ADS  
A23L 1/305

【発明者】  
【住所又は居所】 静岡県浜松市半田山 1 丁目 20 番 1 号 浜松医科大学産婦人科  
【氏名】 小林 浩

【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県筑波郡谷和原村絹の台 4 丁目 3 番地 不二製油株式会社  
つくば研究開発センター内  
【氏名】 吉田 隆治

【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府泉佐野市住吉町 1 番地 不二製油株式会社 阪南事業所内  
【氏名】 福田 洋一

【特許出願人】  
【代表出願人】  
【識別番号】 000236768  
【氏名又は名称】 不二製油株式会社  
【代表者】 浅原 和人  
【電話番号】 0724-63-1564

【特許出願人】  
【住所又は居所】 静岡県浜松市半田山 1 丁目 20 番 1 号 浜松医科大学産婦人科  
【氏名又は名称】 小林 浩

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 029377  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

大豆クニッツ型トリプシンインヒビターを有効成分とする癌転移抑制剤。

【請求項 2】

大豆クニッツ型トリプシンインヒビターを有効成分とする癌転移抑制食品。

【請求項 3】

該食品が癌転移の予防もしくは治療用と表示された食品、又は間接的表示により癌転移の予防もしくは治療用と表示されているに等しい食品である請求項 2 記載の癌転移抑制食品。

【書類名】明細書

【発明の名称】癌転移抑制剤及び食品

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌の転移を抑制する薬剤及び食品に関する。

【背景技術】

【0002】

我が国では、1981年以降、癌が死因の1位を占め続けており、全死因の1/4は癌によるものである。癌が死亡原因の第1位を占めている現在、癌撲滅が人類にとっての最大の課題となっている。現在、癌全体の治癒率は50%であり、固形腫瘍では進行癌の治癒率は現在でも10%しかない。癌患者が死亡するのは癌が実質臓器に転移するからであり、有効な癌転移抑制剤が開発されれば癌患者、特に進行癌患者の予後は飛躍的に向上する。一方で癌転移を抑制するには長期間摂取を継続することが必要であるため、全く毒性を有さず、安価に提供できることが理想である。

【0003】

我々は先の研究によりヒト羊水中から癌転移を特異的に抑制する生理的物質ビクニンを発見し、ビクニンを用いた動物実験により副作用なく良好な生存率を得たことを報告した（非特許文献1）。しかしビクニンを癌患者に長期間投与するためには大量のヒト羊水を集め、これからビクニンを精製しなければならないため、非常に高価となり実用的ではないし、癌患者の経済的負担も大きい。

【0004】

ところで、大豆の中にはトリプシンインヒビターが含まれており、特に分離大豆蛋白を製造する際に副生される大豆ホエー中に比較的豊富に含まれる。大豆トリプシンインヒビターは、クニッツ型トリプシンインヒビター（「KTI」と称する。）とボーマンバーク型トリプシンインヒビター（「BBI」と称する。）とに種別される（非特許文献2）。そして大豆ホエーの画分には抗皮膚癌効果を有すること（特許文献1）やKTIには制癌作用増強効果を有すること（特許文献2）が報告されている。

しかしながら、これらの報告はいずれも大豆トリプシンインヒビターが癌自体の発生を抑制する制癌剤としての作用や、他の制癌剤との併用による制癌作用の増強作用について開示しているのみである。かかる制癌作用は癌細胞に対する直接的な増殖抑制作用や殺細胞作用を示しているだけであるので、大豆トリプシンインヒビターにすでに形成した微小転移巣が増大し、転移・再発を発症するのを抑制することは全く開示されていない。

【0005】

【特許文献1】特開平6-145061号公報

【特許文献2】特開平7-10773号公報

【非特許文献1】Kobayashi H., Shinohara H., Gotoh J., Fujie M., Fujishiro S., Terao T.: Anti-metastatic therapy by urinary trypsin inhibitor in combination with an anti-cancer agent. Br. J. Cancer 72: 1131-1137, 1995.

【非特許文献2】池中徳治：豆科植物プロテアーゼ・インヒビターの構造と阻害機構，蛋白質 核酸 酵素，Vol.27, No.12, 1738-1746, 1982.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

以上のように、ビクニンのような強力な癌転移抑制作用を示し、かつ安価に大量に入手が可能な癌転移抑制剤は未だ知られていない。すなわち本発明は、かかる癌転移抑制剤を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記の課題に鑑み、ビクニンの分子構造を検索したところ、大豆由来のクニッツ型トリプシンインヒビター（以下、「KTI」と称する）と極めて高い相同性を有す

ることを確認した。そこでKTIの投与による癌転移抑制効果を調べたところ、強力な癌転移抑制活性を見出すに到った。KTIは大豆から分離大豆蛋白などを調製する際に大量に排出される大豆ホエー中に多く含まれており、大豆ホエーは安価に入手できるため、これを原料として大量に抽出・精製すれば臨床応用が可能である。

#### 【0008】

即ち、本発明が提供するのは、大豆クニッツ型トリプシンインヒビターを有効成分とする癌転移抑制剤、及び大豆クニッツ型トリプシンインヒビターを有効成分とする癌転移抑制食品である。

#### 【発明の効果】

#### 【0009】

本発明によれば、従来充分に活用されていなかった大豆ホエーから大豆KTIを精製することにより、強力な癌転移抑制作用を示しかつ副作用がなく臨床応用が可能な癌転移抑制剤を安価に大量に提供することができる。したがって、比較的早期がんであっても転移する可能性を否定できない症例や、すでに転移巣が形成された癌患者であってもそれ以上の癌転移を抑制するためには極めて有用であり、薬剤や機能性食品として長期の投与が可能である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0010】

##### (KTIの調製方法)

本発明の有効成分であるKTIは、主に大豆中のホエー成分に含まれており、これをKTI濃縮物又は単離物として調製したものを使用することができる。調製方法は公知の方法を使用すればよく、特に限定されないが、例えば以下のようにして調製するのが好適である。

#### 【0011】

本発明で用いる大豆ホエーは、大豆トリプシンインヒビターを含む大豆ホエーが使用できる。すなわち、それが生じる過程で大豆トリプシンインヒビターが失活するほどの熱履歴を受けていないものが好ましい。

大豆ホエーは、大豆から分離大豆蛋白、あるいは濃縮大豆蛋白を製造する過程で副生する。熱披瀝の少ない大豆ホエーは、例えば、低変性脱脂大豆を水によって中性付近で抽出後オカラ成分を除去した脱脂豆乳を、等電点付近（例えばpH 4.5付近）で大豆蛋白質を凝集沈殿させて除いた溶液として得ることができる。

#### 【0012】

工業的に分離大豆蛋白を製造する過程で副生される大豆ホエーは、多量に品質の安定した原料として利用することができるので好都合であり、通常このホエーは典型的には、固形分が約3%程度で、その固形分組成（以下において「dry%」ともいう）は粗蛋白質20%、灰分20%、糖質60%程度で構成されており、脱脂大豆からの水抽出倍率が変わっても大豆ホエーの固形分組成の変動は殆ど無い傾向にある。そして、固形分が3%程度であれば、大豆トリプシンインヒビターが活性として5unit/ml程度含まれており、本発明に好適に用いることができる。

#### 【0013】

本明細書における大豆トリプシンインヒビター活性の測定法はA. O. C. S. の公定法に基づいたBAPA法を用いて定量する。

#### 【0014】

大豆ホエーよりトリプシンインヒビターを分離するには種々の方法があるが、塩析により沈殿として回収する方法が容易である。例えば固形分が3%のホエーに対しては、硫酸ナトリウムを14%になるように添加し、pHを1.7～5.2好ましくは2.7～4.8の範囲に保持する事で、トリプシンインヒビターを凝集沈殿として回収できる。あるいはホエーをトリプシンインヒビターが失活しない温度で濃縮し、固形分を40%程度まで高め、pHを1.7～5.2好ましくは2.7～4.8の範囲に保持する事で、内在の塩により塩析され、トリプシンインヒビターを凝集沈殿として回収できる。濃縮手段は公知の手段を利用できるが、減圧下で濃縮すると温度上昇を防ぎ効率良く濃縮できる。また塩析と

濃縮を組合せて回収することも可能である。得られたトリプシンインヒビター濃縮物は KTI としても濃縮されているため、これを KTI 濃縮物として当然本発明に利用可能である。

#### 【0015】

さらに、KTI の力価を上げるためには、トリプシンインヒビター濃縮物から BBI を可及的に分離除去することが好ましい。KTI と BBI の分離方法も公知の方法を用いることができるが、分離に際しては、トリプシンインヒビターのクニッツ型トリプシンインヒビター (KTI) は pH 4.5 の等電点を、ボーマンバーク型トリプシンインヒビター (BBI) は pH 4.2 の等電点を有するものの、大豆ホエーをそのまま夫々の等電点で pH を調整して等電点沈殿を試みても目的物質の凝集沈殿は生じない、或いは極めて微量である点に留意する必要がある。そこで以下の分離方法が好適である。

#### 【0016】

トリプシンインヒビターの凝集沈殿物に加水し pH 2.0 ~ 4.8 好ましくは pH 3.0 ~ pH 4.4 の範囲で一部溶解を行い更に固液分画することができる。この固液分画により得られる液体部が BBI 濃縮物、固体部物が KTI 濃縮物とすることができる。これは加水により塩濃度が、濃縮ホエーのそれより低くなるため、BBI は再溶解してくるのに対して KTI は溶解せず、両者を上清と沈殿とに分画することができるのである。加水の程度は凝集沈殿物 (含水物) に対し 1.5 倍以上、好ましくは 2 から 10 倍、もっとも好ましくは 2.5 から 4 倍が好ましい。得られた KTI はそのまま、あるいは中性で再溶解後に、水を含んだまま、あるいは乾燥して、以下に示す様に使用する事が出来る。

#### 【0017】

本発明の癌転移抑制剤は、上記 KTI を有効成分として含有するものであり、医薬品として投与される場合はそれ単独で又は薬学的に許容される担体と混合して各種の投与形態に調製して投与される。いずれの場合もこれらは適当な薬学的に許容される担体を用いて通常の方法に従い、製剤組成物とされる。ここで用いられる担体としては通常の薬剤に汎用される各種のもの、例えば充填剤、増量剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤等の希釈剤乃至賦形剤等を例示できる。

#### 【0018】

本発明の癌転移抑制剤を、ヒトを含む哺乳動物の癌の転移の抑制の目的で使用する際の投与単位形態は特に限定されず、治療目的に応じて適宜選択でき、具体的には錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射剤、軟膏剤、貼付剤等を例示できる。

#### 【0019】

錠剤の形態に成形するに際しては、担体として例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸等の賦形剤、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン酸、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤、第 4 級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を使用できる。更に錠剤は必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠、多層錠等とすることができる。

#### 【0020】

丸剤の形態に成形するに際しては、担体として例えばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤、アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン、エタノール等の結合剤、ラミナラン、カンテン等の崩壊剤等を使用できる。

**【0021】**

カプセル剤は、本有効成分を上記で例示した各種の担体と混合し、硬質ゼラチンカプセル、軟質カプセル等に充填して調製される。

**【0022】**

坐剤の形態に成形するに際しては、担体として例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、ハードバター、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、半合成の例えばエステル交換法により得たグリセライド等を使用できる。

**【0023】**

注射剤として調製される場合、液剤、乳剤及び懸濁剤は殺菌され、且つ血液と等張であるのが好ましく、これらの形態に成形するに際しては、希釈剤として例えば水、乳酸水溶液、エチルアルコール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を使用できる。尚、この場合等張性の溶液を調製するに十分な量の食塩、ブドウ糖或いはグリセリンを医薬製剤中に含有せしめてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤等を添加してもよい。

**【0024】**

軟膏剤、例えばペースト、クリーム及びゲルの形態に調製する際には、希釈剤として例えば白色ワセリン、パラフィン、グリセリン、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト等を使用できる。

**【0025】**

更に上記各製剤には必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の医薬品を配合してもよい。

**【0026】**

本発明の癌転移抑制剤中に含まれるKTIの量は特に限定されず1日の投与量に併せて適宜選択すればよいが、通常、製剤中1～90重量%とすることができる。

**【0027】**

本発明癌転移抑制剤の投与方法は特に限定されず、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、患者の症状の程度等に応じて決定される。例えば錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤及びカプセル剤は経口投与される。坐剤は直腸内投与される。注射剤は単独で又はブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して静脈内投与され、更に必要に応じ単独で動脈内、筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与される。軟膏剤は、皮膚、口腔内粘膜等に塗布される。

**【0028】**

本発明癌転移抑制剤の有効成分の投与量は、用法、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度、目的等により適宜選択でき、特に限定されない。通常、KTIの量が0.2～30g/日程度の範囲となる量を目安とするのがよいが、かかる上限と下限を超える範囲を設定することを妨げない。これら本発明癌転移抑制剤は1日に1回又は2～4回程度に分けて投与することができる。

**【0029】**

本発明の癌転移抑制剤が適用できる癌の種類は特に限定されないが、例えば肺癌、卵巣癌、悪性黒色腫、子宮癌、小腸・大腸癌、乳癌、線維肉腫、白血病等の悪性腫瘍の転移抑制剤として使用することができる。

**【0030】**

上記KTIは、極めて良好な癌の転移抑制作用を有するものであるので、該KTIを有効成分として各種食品に配合し、癌転移抑制食品とすることも可能である。各種食品への添加量は上記目安量と同等の量を食品で摂取できるように調製してもよいし、比較的早期の癌の場合は予防的に上記目安量未満の量を摂取できるようにしてもよい。食品は特に限定されることはなく、クリーム等の水中油型乳化食品、マーガリン等の油中水型乳化食品、茶系飲料、清涼飲料、乳製品、豆乳、発酵豆乳、大豆蛋白飲料、豆腐、納豆、油揚げ、厚揚げ、がんもどきなどの大豆製品、ハンバーグ、ミートボール、ナゲットなどの肉加工品、惣



菜類、菓子類、パン類、米飯類、タブレットなど様々な食品に適用できる。KTIは容易に食品中の含有量を測定できるので、これを有効成分（関与成分）として食品の包装等に、癌転移抑制作用を有するため癌転移の予防や治療に適する旨、KTIが有効成分である旨、KTIの有効摂取量等を直接的に表示した健康用途の食品にもすることができる。もちろん、かかる直接的表示がなされなくとも、その食品を摂取すれば癌転移の予防や治療に効果があることをイメージさせるような間接的な表示にし、かかる効果が表示されているに等しい健康用途の食品も本発明には包含される。

#### 【0031】

本発明の癌転移抑制剤及び癌転移抑制食品は、ビクニンなどの他の癌転移抑制作用を示す有効成分を併用することも所望により可能である。また、制癌作用を示す有効成分を併用することも可能であり、癌の発生とその転移を総合的に抑制することも可能である。

#### 【0032】

従来の制癌剤は癌患者の癌細胞に直接作用させることにより、癌細胞を殺す働きを有するものの、癌細胞を全滅させることは困難であり、1個でも癌転移活性を有する癌細胞が残ってれば、他の組織への癌転移が生じうるため、癌の転移まで抑制することができない。また癌細胞と共に正常な細胞にまで影響を与える可能性がある。本発明の癌転移抑制剤にはこのような殺細胞作用はなく、癌細胞の癌転移活性を抑制するものであるため、かかる制癌剤の過剰投与・長期投与による人体への負担も軽減でき、癌治療・予防の根本的解決を図りうる。

#### 【0033】

以下に実施例を記載するが、この発明の技術思想がこれらの例示によって限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0034】

〔製造例〕KTIおよびBBIの調製

大豆ホエー 200 kg（乾物固形分 3.0 重量%、pH 4.6、総トリプシンインヒビター力価 960,000 unit、粗たん白含有量 20.3 dry%、灰分 20.1 dry%、糖質 59.6 dry%）を大川原製作所製エバポール（CEP-L型）にて大豆ホエーの蒸発温度 50℃、加熱温度 80℃の条件で減圧濃縮して乾物固形分 42.2 重量%、総トリプシンインヒビター力価 930,000 unit（66 unit/g）の濃縮ホエーを 14,000 g（付着等で約 200 gロス）得た。濃縮ホエーを 15℃に冷却してリン酸により pH 4.0 に調整し 10℃にて 3 時間静置した後遠心分離（1,500 G×10 分）を行い上清と沈殿に分けた。分離した上清は 12,850 g 得られ乾物固形分は 14.3 重量%、総トリプシンインヒビター力価 110,500 unit（8.6 unit/g）となり、沈殿は 1,150 g 得られ、乾物固形分は 52.3 重量%、総トリプシンインヒビター活性 820,000 unit（713 unit/g）であった。従ってトリプシンインヒビターは上清に 11.9%、沈殿に 88.1%の割合であった。沈殿 1,000 g へ水 2,000 g を加え沈殿させた pH 4.0 を維持しながらホモキサーを用いて（4,000 rpm×15 分）攪拌し溶解させた後遠心分離（5,000 G×10 分）して上清（BBI）と沈殿（KTI）に分けた。上清（BBI）は 2,767 g 得られ固形分 14.2%、総トリプシンインヒビター力価 595,000 unit（215 unit/g）で、沈殿（KTI）は 233 g 得られ固形分 55.8% 総トリプシンインヒビター力価 221,000 unit（948 unit/g）となった。それぞれを凍結乾燥し、以降の実験に供した。

#### 【0035】

#### 〔試験例〕

#### ・試薬の調整

KTIとBBIは大豆ホエーから抽出精製し、以下の実験に供した。

ウロキナーゼ、合成基質、プラスミノゲン、プラスミンはAmerican Diagnostica 社(Gr eenwich, CT)より購入し、抗ERK、抗MEK1/2、抗Akt、および抗リン酸化ERK、抗リン酸化M

EK1/2、抗リン酸化Akt抗体はNew England Biolabs社(Beverly, MA)より購入した。

#### 【0036】

##### ・培養癌細胞

マウス肺がん培養細胞3LL(中外製薬(株)製)を使用した。実験に供したマウスはC57BL/6のブラックマウスである。ヒト卵巣癌細胞HRAはヌードマウスに移植して実験した。

#### 【0037】

##### ・培養液の調整法

12穴シャーレに1 ( $10^6$ ) の癌細胞を入れて培養し、16時間後にシャーレに壁着した癌細胞を洗浄し新規に0.3 mlの培養液を入れた。そのときにKTIとBBIを0.1, 1.0, あるいは10 (M) となるように同時添加した。さらに癌細胞からのウロキナーゼ産生を刺激するためにG-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) を加えてウロキナーゼを強発現させた系でも同様の実験を行なった。24時間後に培養液を回収した。蛋白質はBio-Rad社性の蛋白質定量測定キットを使用して測定した。

#### 【0038】

〔マウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによるウロキナーゼ産生抑制作用の評価〕  
培養液にサンプルバッファーを加えて電気泳動実験を行なった。このゲルの上にカゼインゲルをのせてウロキナーゼが溶解したバンドをデンストメーターで定量した。結果を図1に示した。このバンドの溶解面積が大きいほど活性のあるウロキナーゼが多く発現していることを示す。KTIあるいはBBIを0.1, 1.0, 10 (M) の濃度で12時間添加すると、KTI添加(バンド2~4)の癌細胞からのウロキナーゼ産生の発現は容量依存性に抑制された。しかし、BBI添加(バンド5~7)にはウロキナーゼは発現抑制作用は認められなかった。G-CSF (0.1 (g/ml)) により癌細胞を刺激してウロキナーゼ産生を促進させた場合でも同様にKTIを添加することにより(バンド9~11) ウロキナーゼ産生の発現は容量依存性に抑制されたが、BBI添加(バンド12~14)ではウロキナーゼ産生の発現を抑制しなかった。

#### 【0039】

〔癌細胞表面に発現するウロキナーゼ活性の評価〕

96穴シャーレに1 ( $10^4$ ) の癌細胞を入れて培養し16時間後にシャーレに壁着した癌細胞を洗浄し新規に0.1 mlの培養液を入れた。そのときにKTIとBBIを0.1, 1.0, あるいは10 (M) となるように同時添加した。さらに癌細胞からのウロキナーゼ産生を刺激するためにG-CSFを加えた系でも実験した。24時間後に培養液を捨ててウロキナーゼ測定用の合成基質を添加することによりパラニトロアニリンの黄色の発色をOD405 nmで測定した。結果を図2に示した。癌細胞表面のウロキナーゼ活性はKTIにより容量依存性に抑制された(バンド2~4)。しかし、BBIにはウロキナーゼ活性抑制は認められなかった(バンド5~7)。

#### 【0040】

〔マウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる癌浸潤抑制作用〕

##### ・癌細胞浸潤能測定

ボイデンチャンバーを用いた癌細胞浸潤アッセイのために、上段のチャンバーに $10^5$  個の癌細胞を入れて24時間後にフィルターの下面に移動した細胞をカウントした。KTIあるいはBBIを0.1, 1.0, 10 (M) の濃度でBoyden chamber assay法でがん浸潤の程度を評価した。浸潤能を評価するためにはフィルターに人工基底膜であるMatrigelをコートした。結果を図3に示した。がん浸潤はKTIにより容量依存性に抑制された(バンド2~4)。しかし、BBIにはがん浸潤抑制作用は認められなかった(バンド5~7)。

#### 【0041】

〔マウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる肺転移抑制作用(Experimental metastasis)〕  
Experimental metastasis法とは、癌細胞を $2.5 \times 10^5$  cells/50 (1/mouseでマウスの尾静脈から静注することにより癌細胞を強制的に血管の中に注入する方法である。標準飼料1 kgに5, 15, 50 gのKTIあるいはBBIを混ぜたものを毎日食べさせた場合の3週間後の肺転移数を比較した。

結果を図4に示した。KTI（バンド2～4）とBBI（バンド5～7）のいずれも肺転移は抑制されなかった。

#### 【0042】

〔マウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる肺転移抑制作用(Spontaneous metastasis)〕

Spontaneous metastasis法とは、癌細胞を $1.0 \times 10^6$  cells/50 (1/mouseでマウスの腹部皮下に移植した後の肺転移を見る方法である。標準飼料1 kgに5, 15, 50 gのKTIあるいはBBIを混ぜたものを毎日食べさせた場合の4週間後の肺転移数を比較した。

結果を図5に示した。KTI（バンド2～4）のみ容量依存性に肺転移は抑制された。しかし、BBI（バンド5～7）には肺転移抑制作用は認めなかった。

#### 【0043】

癌細胞は皮下に移植されると、まず局所で増殖し血管新生を獲得してマウスの血管に入り、さらに血管から目的とする肺の毛細血管に接着してから肺転移を形成する。Experimental metastasisでは効果がないのにspontaneous metastasisで抑制されるということは癌細胞が血管の中に入る過程のどこかをKTIが抑制していることがわかる。癌細胞が血管内に侵入した後はKTIによる癌転移抑制効果は低くなると考えられる。

#### 【0044】

〔ヒト卵巣癌細胞HRAのKTIとBBIによる癌性腹膜炎抑制作用(Peritoneal disseminated metastasis)〕

Peritoneal disseminated metastasis法とは、癌細胞を5 ( $10^6$  cells/mouseでヌードマウスの腹腔内に投与することにより癌細胞を強制的に腹腔内に注入し、癌性腹膜炎を起こさせる方法である。標準飼料1 kgに5, 15, 50 gのKTIあるいはBBIを混ぜたものを毎日食べさせた場合の9日目の癌性腹膜炎の程度を比較した。

結果を図6に示した。KTIのみ容量依存性に癌性腹膜炎は抑制された（バンド2～4）。しかし、BBIには癌性腹膜炎抑制作用は認められなかった（バンド5～7）。

#### 【0045】

〔マウス肺癌細胞3LLとヒト卵巣癌細胞HRAにおけるKTIとBBIによるシグナル伝達抑制作用〕

##### ・ウエスタンブロット

電気泳動した蛋白質をニトロセルロース膜に転写し、各種抗体（濃度は $0.1 \mu\text{g/ml}$ ）を用いてウエスタンブロットを行なった。

癌細胞が増殖、転移するためには各種増殖因子やサイトカインという物質を利用する。今回注目している癌転移に関してはウロキナーゼによる細胞外マトリックスの破壊がもっとも重要である。今回使用した癌細胞の3LLはG-CSFによりウロキナーゼ産生が亢進することがわかっている。一方、HRA細胞に関してはTGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1)で刺激することによりウロキナーゼ産生が亢進することが確認されている。G-CSFやTGF- $\beta$ 1が癌細胞の膜のリセプターに結合するとMAP kinase (MEK, ERK)やPI3 kinase (Akt)が活性化（リン酸化）されて最終的にウロキナーゼ発現が促進するという、シグナル伝達が関与している。

図7に示すように、KTIやBBIを同時投与することによりKTIのみMEK, ERK, Aktのリン酸化が抑制され（バンド2, 5, 8, 11）、結果としてウロキナーゼ発現が抑制されることが判明した。BBIにはこれらのシグナル伝達を抑制する作用は認められなかった（バンド3, 6, 9, 12）。この結果により、KTIはウロキナーゼ産生というシグナル伝達にブレーキをかけて癌転移を抑制していることが推定される。

#### 【0046】

以上より、大豆由来KTIはマウス肺癌細胞が原発巣から血管内に侵入しようとする過程を抑制することが判った。この過程にはウロキナーゼが癌細胞周囲の結合組織を破壊して浸潤転移する過程を抑制しているものと推定される。一旦、癌細胞が血管内に侵入してしまうとその転移を抑制することは困難であった。したがって、KTIは癌細胞の初期の浸潤過程を抑制していることが確認された。

癌細胞は周囲の結合組織を酵素学的に破壊してがん浸潤が起こるものと考えられており、こ

の酵素にはウロキナーゼやマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)が重要である。KTIは癌細胞からのウロキナーゼ産生を抑制し、がん転移を止めると考えられる。

【産業上の利用可能性】

【0047】

医学分野では具体的には日本の癌による死亡数が男性17万人、女性11万人とすると最低でも約30万人が癌転移抑制剤の使用対象患者になると予想される。癌と共存を図るためには長期間使用し続ける必要がある。しかし、がん転移抑制剤の本来の使用方法は比較的早期がんを対象とし、がん転移を根本的に制御しようとする場合に再発の危険のある数年間、転移抑制剤を内服することが理想であると思われる。これらを総合すると50万人以上の患者が本薬剤や食品の使用対象者となるものと考えられる。大学、研究機関のみならず製薬企業にもがん転移制御に関する研究の需要が拡大している。さらに、バイオインフォマティクス市場は、医学分野、食品業界や環境関連業界にも広がっており、バイオインフォマティクス企業の中には、環境分野の事業を行ったり、食品業界や環境関連業界への展開を視野に入れている企業も存在する。バイオインフォマティクス市場は、今後もますます拡大していくと考えられる。このような背景のもと、本薬剤の臨床応用により製薬業界の改革が起こることが予想され、さらには健康用途の食品業界の発展にまで期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】 マウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによるウロキナーゼ(ウロキナーゼ)産生抑制作用を示す電気泳動図及びデンストメーターによる測定値を示すグラフである。

【図2】 マウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる癌細胞表面のウロキナーゼ(ウロキナーゼ)活性を示すグラフである。

【図3】 マウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる癌浸潤抑制作用についてBoyden chamber assay法により測定したグラフである。

【図4】 Experimental metastasis法によりマウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる肺転移抑制作用を測定したグラフである。

【図5】 Spontaneous metastasis法によりマウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる肺転移抑制作用を測定したグラフである。

【図6】 Peritoneal disseminated metastasis法によりマウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる癌性腹膜炎抑制作用を測定したグラフである。

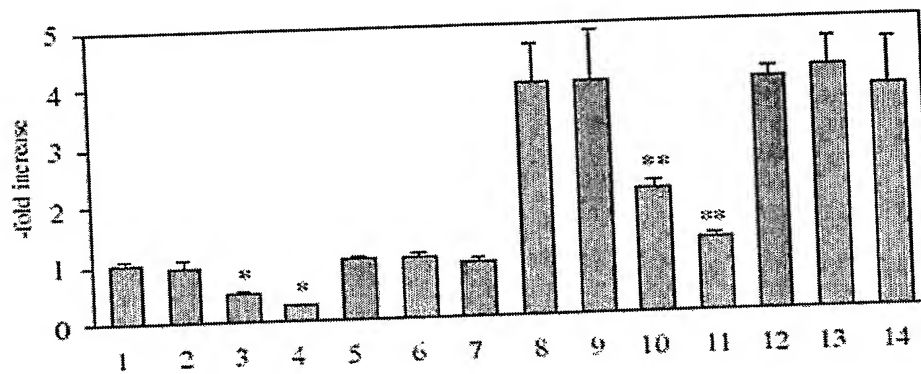
【図7】 マウス肺癌細胞3LLとヒト卵巣癌細胞HRAにおけるKTIとBBIによるシグナル伝達抑制作用を示すグラフである。

【書類名】 図面

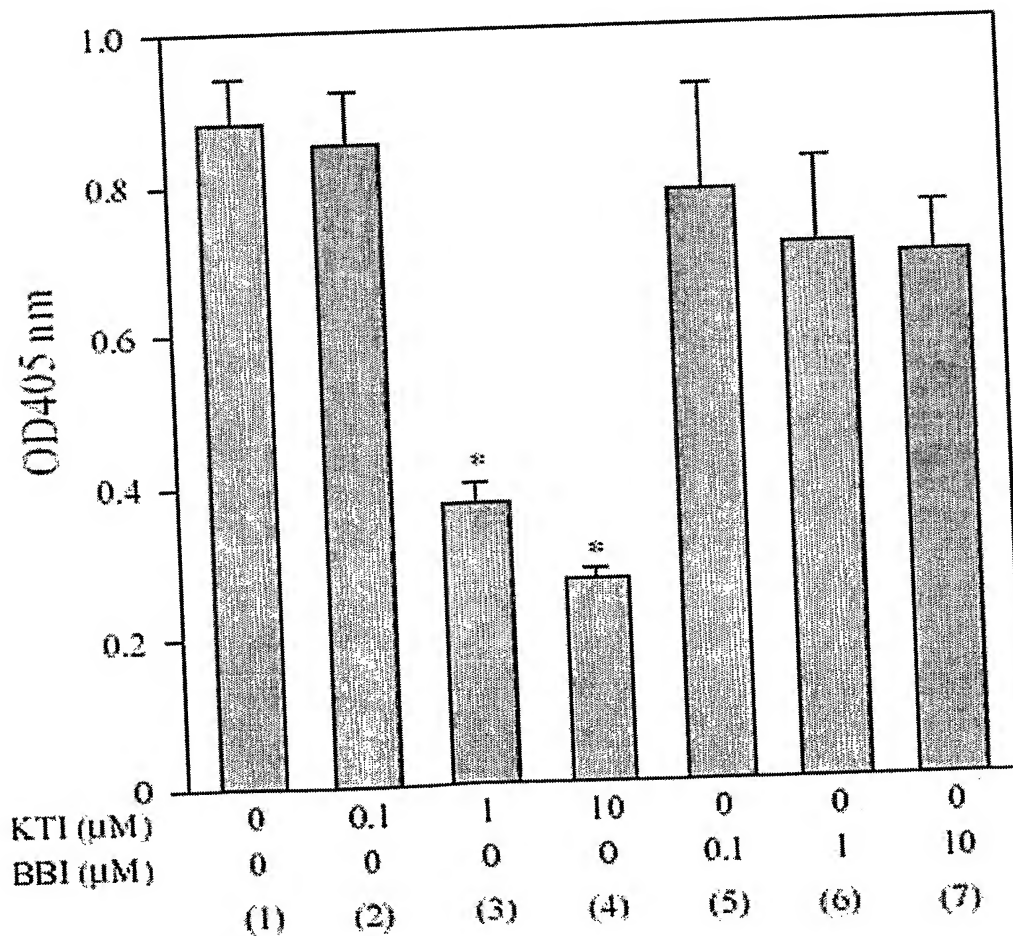
【図 1】

KTI ( $\mu$ M)	0	0.1	1	10	0	0	0	0	0.1	1	10	0	0	0
BBI ( $\mu$ M)	0	0	0	0	0.1	1	10	0	0	0	0	0.1	1	10
PMA ( $\mu$ M)	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1

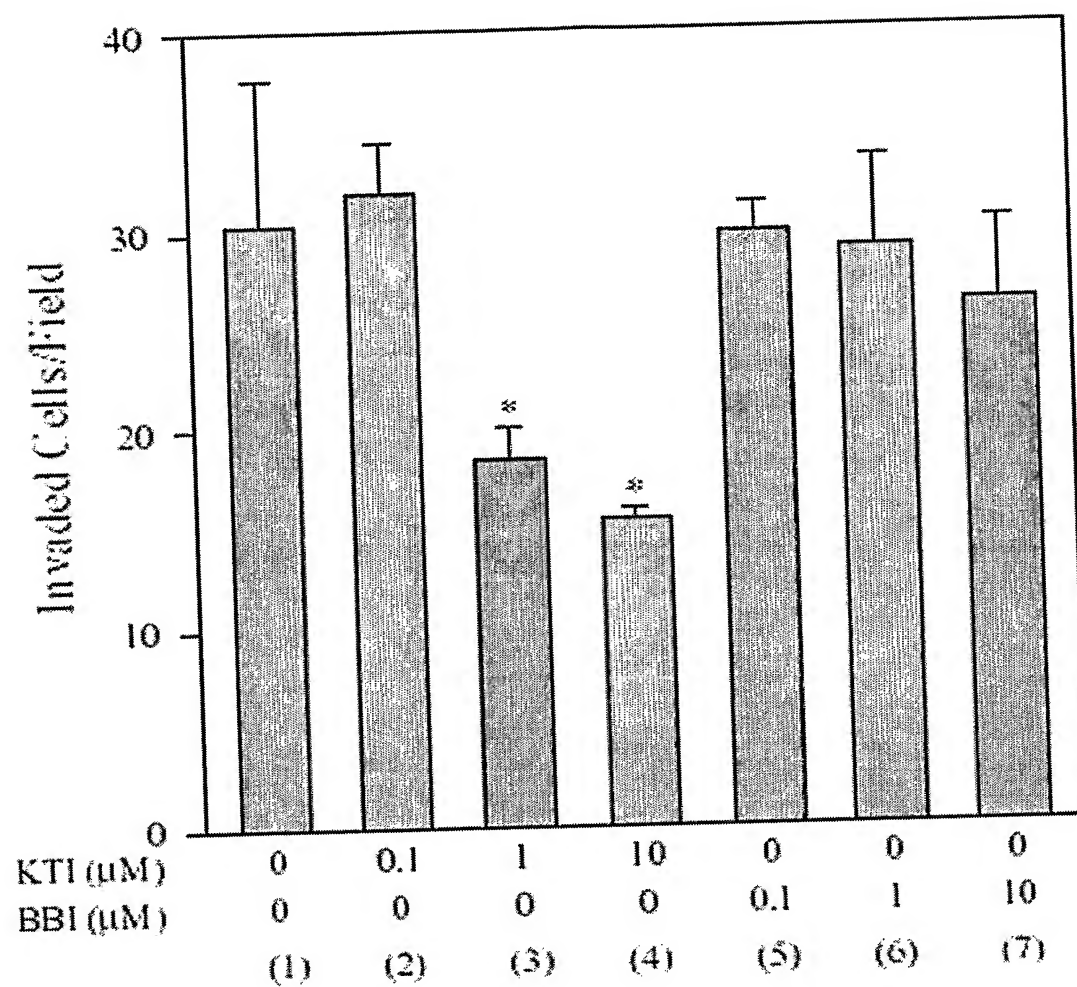
uPA →  50 kDa



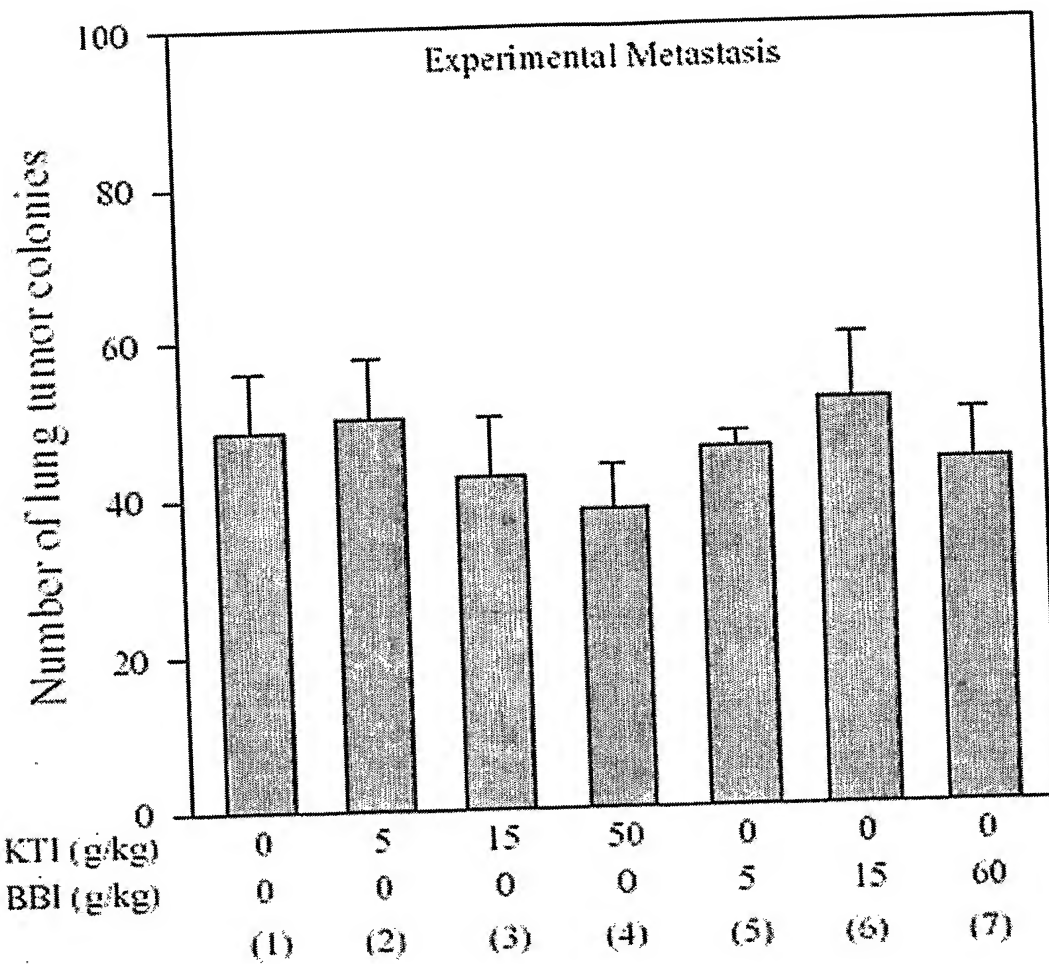
【図 2】



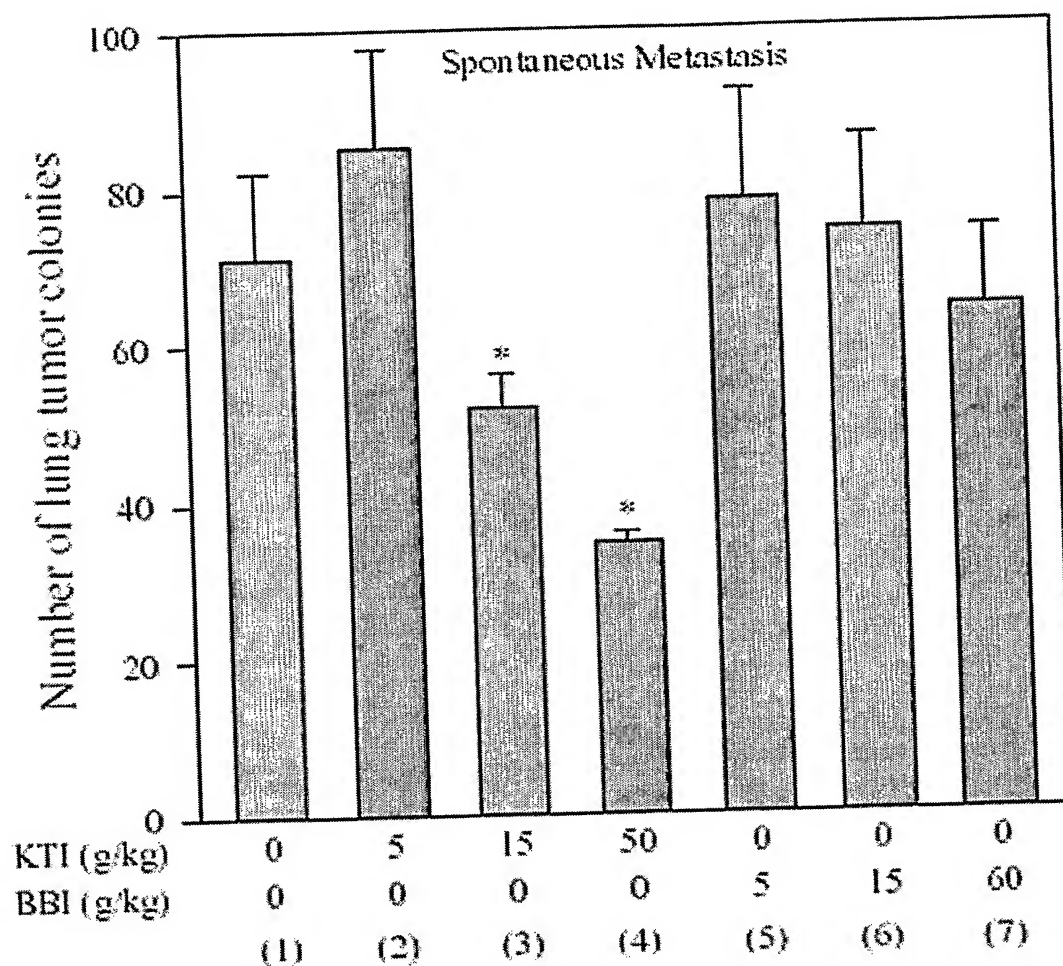
【図 3】



【図 4】

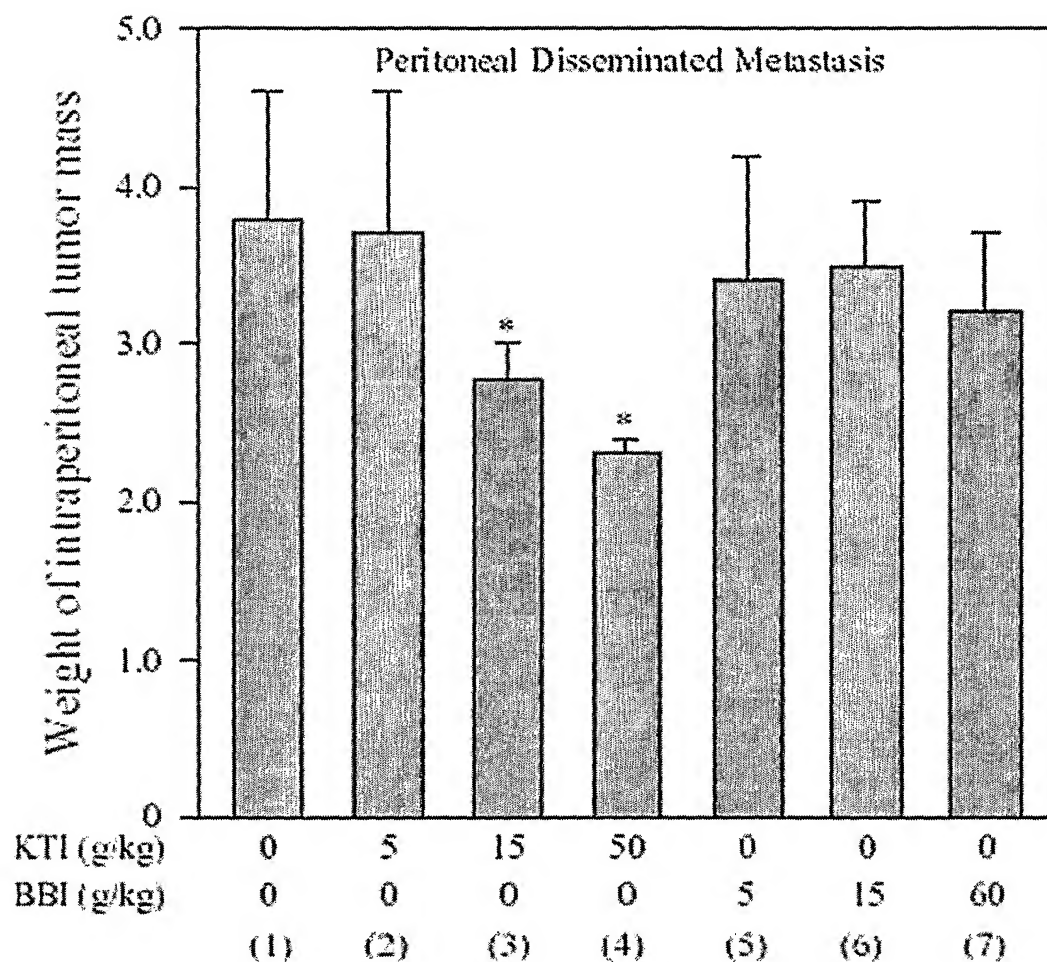


【図 5】

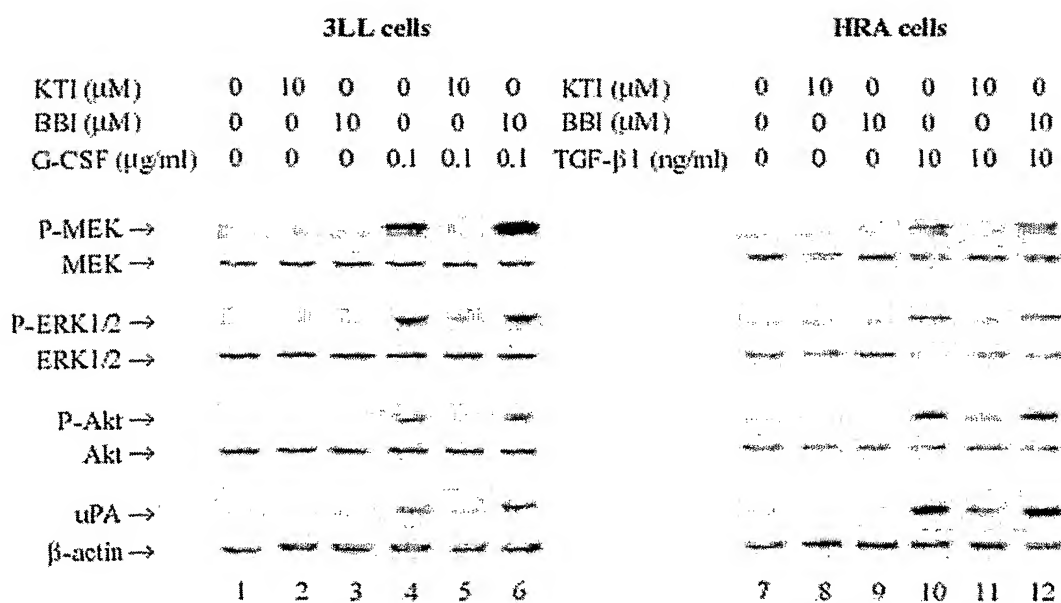




【図 6】



【図 7】



## 【書類名】 要約書

## 【要約】

【課題】 ビクニンのような強力な癌転移抑制作用を示し、副作用がなく、かつ安価に大量に入手が可能な癌転移抑制剤を提供する。

【解決手段】 大豆クニッツ型トリプシンインヒビター (KTI) の投与による癌転移抑制効果を調べたところ、強力な癌転移抑制活性を見出すに到った。KTIは大豆から分離大豆蛋白などを調製する際に大量に排出される大豆ホエー中に多く含まれており、大豆ホエーは安価に入手できるため、これを原料として大量に抽出・精製すれば臨床応用が可能である。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 5 4 5 5 4
受付番号	5 0 4 0 0 3 2 5 3 2 4
書類名	特許願
担当官	神田 美恵 7 3 9 7
作成日	平成 1 6 年 4 月 1 9 日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】	平成16年 2月27日
【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000236768
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区西心斎橋 2 丁目 1 番 5 号
【氏名又は名称】	不二製油株式会社
【特許出願人】	
【識別番号】	504076806
【住所又は居所】	静岡県浜松市半田山 1 丁目 2 0 番 1 号 浜松医科大学産婦人科
【氏名又は名称】	小林 浩

特願 2 0 0 4 - 0 5 4 5 5 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 2 3 6 7 6 8 ]

1. 変更年月日 1 9 9 3 年 1 1 月 1 9 日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市中央区西心斎橋 2 丁目 1 番 5 号

氏 名 不二製油株式会社

特願 2 0 0 4 - 0 5 4 5 5 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 4 0 7 6 8 0 6 ]

1. 変更年月日

2 0 0 4 年 2 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

静岡県浜松市半田山 1 丁目 2 0 番 1 号 浜松医科大学産婦人科

氏 名

小林 浩